

⑬ 特許公報(B2)

平1-29555

⑫ Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	⑭公告 平成1年(1989)6月12日
C 12 N 1/20		A-8515-4B	
// C 12 P 13/14		A-7236-4B	
(C 12 N 1/20)			
(C 12 R 1:15)			
(C 12 N 1/20)			
(C 12 R 1:13)			
(C 12 P 13/14)			
(C 12 R 1:15)			
(C 12 P 13/14)			
C 12 R 1:13)			

発明の数 1 (全5頁)

⑭発明の名称 L-グルタミン酸の製造法

⑮特 願 昭54-20051

⑯公 開 昭55-114293

⑰出 願 昭54(1979)2月22日

⑱昭55(1980)9月3日

⑲発 明 者 勝 亦 瞭 一 神奈川県相模原市文京1-13-8
 ⑲発 明 者 高 山 健 一 郎 神奈川県厚木市鷺尾1丁目9番10号
 ⑲出 願 人 協和醸造工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 審 査 官 佐 伯 裕 子
 微生物の受託番号 FERM P-4789 FERM P-4790 FERM P-4791
 FERM P-4792 FERM P-4412 FERM P-4413
 FERM P-4414

⑳参考文献 特開 昭54-122794(JP, A)

1

2

㉑特許請求の範囲

1 コリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・リリウム、プレビバクテリウム・フラブムまたはプレビバクテリウム・サツカロリテイクムに属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物。

発明の詳細な説明

本発明はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養してL-グルタミン酸を培地中に蓄積させ、これを採用する方法において、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない菌株を用いることを特徴とするL-グルタミン酸の製造法に関する。

生育にビオチンを要求するL-グルタミン酸生産菌のL-グルタミン酸生産性は培地中のビオチン濃度と極めて密接な関係があり、生育に対して

制限量のビオチン濃度のときはじめてL-グルタミン酸を生産できる。一方安価な培地の粗原料として利用される蔗糖蜜、澱粉加水分解物などはビオチンを多量に含有している。これら粗原料を含有する培地にL-グルタミン酸生産菌を培養する方法としては特公昭37-1695号公報、特公昭38-25288号公報などに記載されている方法が知られているが、工業的にはさらに優れた方法が望まれている。

本発明者らは、安価な粗原料を用い、過剰量のビオチンの作用を回避してL-グルタミン酸を製造する方法につき研究した結果、従来のL-グルタミン酸生産菌を親株として変異誘導したリゾチームに感受性を有する変異株を用いれば、過剰のビオチン含有培地を用いても、ビオチンによる抑制を受けることなく高い収率でL-グルタミン酸を生産できることを見出した。

以下本発明をさらに詳細に説明する。

本発明によればコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性

を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物を培地に培養すれば培地中にL-グルタミン酸が蓄積するので、これを採取することにより高収率にL-グルタミン酸が得られる。

本発明に用いる微生物はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物であればいかなる菌株をも用いることができる。一般にはコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、L-グルタミン酸生産能を有する菌株を親株とし、これを変異誘導処理して得られた変異株からリゾチームに感受性を有するものを選択し、これを用いる。変異誘導の方法としては、紫外線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の通常の方法が用いられる。変異誘導された変異株からリゾチームに感受性を有する菌株を選択するには、親株が生育可能な濃度のリゾチームを含有する培地で生育できなくて、リゾチーム無添加培地では親株と同様に生育できるものを選ばばよい。従つて、ここでリゾチームに感受性であるとは、リゾチームに対する最小阻止濃度が親株よりも低いことを意味する。また培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されないとは、培地中に存在する過剰のビオチンによるL-グルタミン酸生産の抑制が実質的に無視できる程度のものであることを意味する。具体的には前記のごとき粗原料を用いた場合でも過剰のビオチンによる影響をうけることなくL-グルタミン酸の生産ができることを意味する。

本発明に用いる具体的に好適な菌株の一例としては、コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC13032を親株として得られたコリネバクテリウム・グルタミクム KY9703(微工研菌寄第4412号、NRRL11271)、コリネバクテリウム・グルタミクム KY9705(微工研菌寄第4413号、NRRL11272)、コリネバクテリウム・グルタミクム T339(微工研菌寄4789、NRRLB-11433)、コリネバクテリウム・グルタミクム T327(微工研菌寄4790、NRRLB-11434)、コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990から誘導されたコリネバクテリウム・リリウム T322(微工研菌寄4791、

NRRLB-11435)、プレビバクテリウム・フラブム ATCC14067を親株として得られたプレビバクテリウム・フラブム KY9733(微工研菌寄第4414号、NRRL11273) およびプレビバクテリウム・サツカロリテイクム ATCC14066から誘導されたプレビバクテリウム・サツカロリテイクム T321(微工研菌寄4792、NRRLB-11436) があげられる。

- コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC13032を親株としてリゾチーム感受性変異株を取得する方法について以下具体的に説明する。該親株を粉末ブイヨン(極東製薬社製) 20 g/l および酵母エキス 5 g/l の組成を有する培地(殺菌前 pH7.2、以下 C 培地という)に植菌し 30°C で振盪培養する。中期対数期で培養を中止し、集菌し、生理食塩水で洗浄後、M/20 トリス・マレート緩衝液 (pH6.0) に 5×10^8 細胞/ml になるように懸濁する。この懸濁液に最終濃度 500 μ g/ml になるようにニトロソグアニジンを加え、25°C で 30 分間放置し、遠心分離により菌体を集め、同一緩衝液で菌体を洗浄後、生理食塩水に懸濁し、適宜生理食塩水で希釈して C 培地にさらに 2 g/dl の寒天を含む固体培地(以下 CA 培地という)に塗りつける。これを 30°C で 2 日間培養し、生じたコロニー(約 6000)を次の 3 種類の固体培地にレプリカ法により塗りつける。

① CA 培地

② CLA 培地: CA 培地を加熱殺菌後、冷却して培地の温度が 45°C まで下がってから 200 mg/l になるようにリゾチームを添加した培地。

③ MA 培地: グルコース 10 g/l、NH₄Cl 4 g/l、尿素 2 g/l、KH₂PO₄ 1 g/l、K₂HPO₄ 3 g/l、FeSO₄ · 7H₂O 10 mg/l、MgSO₄ · 7H₂O 400 mg/l、MnCl₂ · 4H₂O 2 mg/l、ZnSO₄ · 7H₂O 0.9 mg/l、CuSO₄ · 5H₂O 0.4 mg/l、Na₂B₄O₇ · 10H₂O 0.09 mg/l、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.04 mg/l、ビオチン 30 μ g/l、サイアミン塩酸塩 1 mg/l、システイン塩酸塩 20 mg/l および寒天 20 g/l の組成を有する培地(殺菌前 pH7.0)。

30°C で 2 日間培養後、CA 培地で生育し、CLA 培地で生育しない菌をリゾチーム感受性変異株として得る。MA 培地で親株と同様に生育する自己栄養性でリゾチームに対して感受性の変異株は試

験した6000コロニーの中に110株得られた。この110株中17株がビオチン過剰培地でも多量のL-グルタミン酸を生産する能力を有していた。コリネバクテリウム・グルタミクム KY9703、KY9705、T339およびT327はかくして得られた変異株の一例である。

ブレビバクテリウム・フラブム ATCC14067およびブレビバクテリウム・サツカロリテイクム ATCC14066を親株とする変異誘導も上記と同様に行つて、ブレビバクテリウム・フラブム KY9733およびブレビバクテリウム・サツカロリテイクム T321を得た。

上記例示の変異株のMA培地、CA培地、CLA培地での生育およびリゾチーム感受性度について*

第 1 表

菌 株	生 育			リゾチーム感受性度最小生育阻止濃度 (MIC $\mu\text{g/ml}$)
	MA培地	CA培地	CLA培地	
コリネバクテリウム・グルタミクム				
T 339	+	+	±	400
T 327	+	+	—	200
KY 9703	+	+	—	100
KY 9705	+	+	—	25
ATCC 13032	+	+	+	800
コリネバクテリウム・リリウム				
T 322	+	+	—	50
ATCC 15990	+	+	+	400
ブレビバクテリウム・フラブム				
KY 9733	+	+	—	50
ATCC 14067	+	+	+	800
ブレビバクテリウム・サツカロリテイクム				
T 321	+	+	—	100
ATCC 14066	+	+	+	800

本発明の微生物を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無機化合物、その他の栄養素を適当に含む培地ならば、通常L-グルタミン酸生産に用いられる天然培地、合成培地のいずれも使用できる。たとえば炭素源としては蔗糖、ブドウ糖、糖蜜などの糖質および澱粉糖化液などが、窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、塩酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、磷酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、クエン酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、酢酸

*親株と比較した結果を第1表に示す。3種類の固体培地上での生育はレプリカ法で塗りつけ、30℃で2日間培養後判定した。表中生育欄の+は菌の生育が観察されたものを、-は生育が観察されなかつたものを示す。また表中リゾチーム感受性は次のように試験した。すなわちC培地にて24時間30℃液体振盪培養した菌を集菌後、生理食塩水にて適当に希釈して菌体の懸濁液をつくる。

この懸濁液10⁴細胞相当を倍々系列の濃度のリゾチームを含有するCA培地に滴下接種し、30℃で2日間培養する。菌の生育がまったく認められない最小のリゾチーム濃度を菌のリゾチーム感受性値（最小生育阻止濃度）とした。

アンモニウム、尿素などの有機無機窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカーなどの天然栄養源などが、無機化合物としては磷酸第一カリ、磷酸第二カリ、硫酸カリ、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、硫酸マンガン、塩化マンガンなどが、その他の栄養源としてはビオチン、サイアミンなどが用いられる。

培養は振盪培養、通気攪拌培養などの好気的条件下で行い、培養温度は24~37℃とくに28~33℃が

7

8

好適である。培養中は適当な中和剤を用いてpHを6～9に調整するのが好ましい。培養は1～3日間行えば培養液中に著量のL-グルタミン酸が生成蓄積する。培養液からのL-グルタミン酸の採取は、菌体を除去した上清液から、イオン交換樹脂による吸脱着法、濃縮晶析法、等電点晶析法など、従来のL-グルタミン酸の製造において常用される諸方法を適宜使用して行うことができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例 1

グルコース40g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l、 KH_2PO_4 0.5g/l、 K_2HPO_4 1g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ mg/l、サイアミン塩酸塩1mg/l、フェノールレッド10mg/lおよびビオチン2μg/lあるいは100μg/lの組成を有する培地を調製し、pHを7.0に調整した後、30mlずつ300ml容の枝付フラスコに入れ、115℃で15分間加熱殺菌した。冷却後、別に加熱殺菌した尿素液を2g/lになるように添加した。この培地に第2表に示した菌を接種し30℃で振盪培養を行った。培養中培養液をpH6.5～8.0に保つため12時間目と20時間目の2回尿素液を4g/lになるように添加し、32時間で培養を終了した。かくして培養液中に蓄積したL-グルタミン酸量は、第2表に示す通りである。培養液1lから菌体を除去し、濃縮し、塩酸でpH3.2に調整し、冷却してL-グルタミン酸の粗結晶を得た。粗結晶の量(g)を括弧内に示す。

第 2 表

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 mg/ml	
	ビオチン 2 μg/l 添加培地	ビオチン 100 μg/l 添加培地
コリネバクテリウム・グルタミクム KY9703	9.1 (6.7)	9.3 (6.9)
KY9705	14.5 (10.7)	14.0 (10.4)
ATCC13032	9.0	0.2

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 mg/ml	
	ビオチン 2 μg/l 添加培地	ビオチン 100 μg/l 添加培地
プレビバクテリウム・フラブム KY9733	8.8 (6.5)	8.4 (6.2)
ATCC14067	7.4	0.1

実施例 2

実施例1で用いた培地中グルコースを甘蔗廃糖蜜（グルコースとして40g/l相当量）に換え、加熱殺菌後の培地をpH7.0に再調整する以外は実施例1と同様に行った。培養液中に蓄積したL-グルタミン酸量を第3表に示す。

第 3 表

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム KY9703	11.2
KY9705	15.6
ATCC13032	0.3
プレビバクテリウム・フラブム KY9733	9.7
ATCC14067	0.2

実施例 3

使用菌株を第4表に示す菌株に替えて行う以外は実施例1と同様に行って、第4表に挙げるL-グルタミン酸の蓄積を見た。

9

10

第 4 表

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 ($\mu\text{g}/\ell$)	
	ビオチン 2 $\mu\text{g}/\ell$ 添加培地	ビオチン 100 $\mu\text{g}/\ell$ 添加培地
コリネバクテリウム・ グルタミクム		
T339	9.5	11.8
T327	10.3	13.0
ATCC13032	9.0	0.2
コリネバクテリウム・ リリウム		
T322	9.0	10.0

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 ($\mu\text{g}/\ell$)	
	ビオチン 2 $\mu\text{g}/\ell$ 添加培地	ビオチン 100 $\mu\text{g}/\ell$ 添加培地
ATCC15990	8.3	0.1
ブレヴィバクテリウム・ サツカロリテイクム		
T321	10.5	11.0
ATCC14066	9.5	0.2